

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(12)

(11)Publication number : 2000-279179
 (43)Date of publication of application : 10.10.2000

(51)Int.Cl.

C12N 15/09
 A61K 39/02
 A61K 39/395
 C07K 14/195
 C07K 16/12
 C12P 21/02
 C12P 21/08
 G01N 33/569
 G01N 33/577
 // (C12N 15/09
 C12R 1:01)
 (C12P 21/02
 C12R 1:08)

(21)Application number : 11-094004

(71)Applicant : NATIONAL INSTITUTE OF ANIMAL HEALTH
 HIGETA SHOYU CO LTD
 FUJITA GAKUEN

(22)Date of filing : 31.03.1999

(72)Inventor : TAKAGI HIROAKI
 EBISU SHOGO
 WATANABE FUMIKO
 MURAHASHI YASUAKI
 YOKOMIZO YUICHI
 IMADA YUMIKO
 TSUJI TAKAO

(54) RECOMBINANT SUBUNIT VACCINE AGAINST ERYSIPELOTHRIX RHUSIOPATHIAE

(57)Abstract:

PROBLEM TO BE SOLVED: To obtain a new polypeptide which has a specific amino acid sequence, has an activity of inducing defense and immunization against infection and pathogenesis by *Erysipelothrix rhusiopathiae*, and is useful as a vaccine effective for treating and preventing the infection of *E.rhusiopathiae* and so on.

SOLUTION: This is a new recombinant polypeptide which has the amino acid sequence shown by the formula or an amino acid sequence obtained by deleting, substituting, adding, or inserting one or more amino acid(s) from, in, to, or into the amino acid sequence, has an activity of inducing defense and immunization against infection and pathogenesis by *Erysipelothrix rhusiopathiae*, and is useful as a vaccine effective for treating and preventing the infection of *E.rhusiopathiae* and so on. This polypeptide is obtained by preparing a genomic library from chromosomal DNA of strain Fujisawa which is a typical strong pathogen of *E.rhusiopathiae*, screening the obtained library with a probe having its partial sequence, incorporating the obtained gene into a vector, transforming a host cell such as *Bacillus brevis*, followed by culturing the obtained transformant.

Asp Ser Thr Asp Leu Arg Val Le Pro Lys Ile Glu Glu Ile Glv
 6 15
 Ser Leu Val Leu Ile Gly Lys Glu Val Ile Asp Glu Glu Tyr Asn
 20 25 30
 Cys Met Thr Asp Ile Tyr Ile Glu Lys Lys Val Val Ser Leu Ile Asp Cys
 35 40 45

Ser Leu Val Lys Ser Thr Glu Asp Glu Glu Ser Lys Val Glu
 370 375 380
 Pro Glu Ser Pro Val Ile Asp Glu Ile Asp Pro Val Asp Glu Glu Lys -cm
 385 390 395 400
 Lys Asp

LEGAL STATUS

[Date of request for examination]

31.03.1999

[Date of sending the examiner's decision of rejection]

[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]

[Date of final disposal for application]

3072345

[Patent number]

02.06.2000

[Date of registration]

[Number of appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of requesting appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of extinction of right]

Copyright (C); 1998,2003 Japan Patent Office

(12)

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号
特開2000-279179
(P2000-279179A)

(43) 公開日 平成12年10月10日 (2000.10.10)

(51) Int.Cl.
C 12 N 15/09
A 61 K 39/02
39/395

識別記号
ZNA

F I
C 12 N 15/00
A 61 K 39/02
39/395

テマコト[®] (参考)
Z N A A 4 B 0 2 4
4 B 0 6 4
D 4 C 0 8 5
R 4 H 0 4 5

C 07 K 14/195

C 07 K 14/195
審査請求 有 請求項の数16 O L (全 23 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願平11-94004

(22) 出願日 平成11年3月31日 (1999.3.31)

(71) 出願人 591111248
農林水産省家畜衛生試験場長
茨城県つくば市観音台3-1-1
(71) 出願人 000112060
ヒゲタ醤油株式会社
東京都中央区日本橋小網町2番3号
(71) 出願人 000125381
学校法人藤田学園
愛知県豊明市栄町南館12番地の1
(74) 代理人 100091096
弁理士 平木 祐輔 (外1名)

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 豚丹毒菌の組換えサブユニットワクチン

(57) 【要約】 (修正有)

【課題】 豚丹毒菌感染を治療または予防するためのワクチンの提供。

【解決手段】 特定のアミノ酸配列を有するポリペプチド、または、上記アミノ酸配列において1個または数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列を有し、かつ豚丹毒菌に対する感染、発病防御免疫誘導活性を有するポリペプチド、このポリペプチドをコードするDNA、このDNAを利用する組換えDNA技術によるポリペプチドの製造方法、このポリペプチドを含む豚丹毒菌感染を治療または予防するためのワクチン、あるいは、そのための方法。

1

【特許請求の範囲】

【請求項1】 以下の(a)又は(b)に示すポリペプチド。

(a) 配列表の配列番号1に示すアミノ酸配列を有するポリペプチド

(b) 配列表の配列番号1に示すアミノ酸配列において1個または数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列を有し、かつ豚丹毒菌に対する感染、発病防御免疫誘導活性を有するポリペプチド

【請求項2】 請求項1に記載のポリペプチドをコードするDNA。 10

【請求項3】 配列表の配列番号2に示すヌクレオチド配列を有する、請求項2に記載のDNA。

【請求項4】 請求項1に記載のポリペプチドの製造方法であって、請求項2または3に記載のDNAを含む発現ベクターを作製し、該ベクターで宿主細胞を形質転換し、該形質転換された宿主細胞を培地に培養し、生成した該ポリペプチドを回収することを含む方法。

【請求項5】 前記宿主細胞がバチルス・ブレビスである、請求項4に記載の方法。 20

【請求項6】 前記DNAがその5'末端にバチルス・ブレビス由来のシグナルペプチドをコードするDNA配列を含み、バチルス・ブレビス由来のプロモーターを作動可能に結合されている、請求項5に記載の方法。

【請求項7】 請求項4~6のいずれかに記載の方法によって製造されたポリペプチド。

【請求項8】 請求項1または7に記載のポリペプチドを含む豚丹毒菌感染の治療または予防用のワクチン。

【請求項9】 アジュvantを含む、請求項8に記載のワクチン。 30

【請求項10】 前記アジュvantが大腸菌の変異無毒組換え易熱性腸管毒素(rmLT)である、請求項9に記載のワクチン。

【請求項11】 請求項1または7に記載のポリペプチドに対する抗体。

【請求項12】 ポリクローナルまたはモノクローナル抗体である、請求項11に記載の抗体。

【請求項13】 豚丹毒菌に感染したかまたは感染する可能性のある動物(ヒトを除く)に請求項8~10のいずれかに記載のワクチンまたは請求項11もしくは12に記載の抗体を投与することを含む、豚丹毒菌感染を治療または予防する方法。

【請求項14】 前記投与が鼻腔内投与等の経粘膜投与によって行われる、請求項13に記載の方法。

【請求項15】 豚丹毒菌に感染したかまたは感染する可能性のある動物(ヒトを除く)に、請求項1または7に記載のポリペプチドとrmLTアジュvantとの混合物を、場合によりさらに担体を加えて、鼻腔内投与等の経粘膜投与することを含む、豚丹毒菌攻撃に対する感染、発病防御免疫誘導する方法。 40

2

【請求項16】 請求項1もしくは7に記載のポリペプチドまたは請求項11もしくは12に記載の抗体の、ワクチン接種動物または移行抗体を保有する幼若動物の豚丹毒菌感染防御免疫レベルの評価、あるいは動物の豚丹毒菌感染の検出への使用。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は豚丹毒菌の組換え防御ポリペプチド抗原(recombinant protective polypeptide antigen; rPPA)、その製法、該ポリペプチドをコードするDNA、該ポリペプチドに対する抗体、サブユニットワクチンとしての該ポリペプチドの使用に関する。

【0002】

【従来の技術】豚丹毒菌(*Erysipelothrix rhusiopathiae*)は豚、イノシシ、鯨類、鶏、七面鳥などの食用動物に病原性をもち、畜産の生産性に大きな被害を与えてきた。家畜伝性病予防法において豚丹毒は監視伝性病の一つに指定され豚において年間3,000頭前後の発生報告がある。また本菌は人にも病原性をもつこと、食肉処理場での多数の豚丹毒症例が摘発されることから、豚肉や内臓から生産される食品の安全性にも脅威となっている。

【0003】わが国では、強毒株をアクリフラビン添加培地で長期継代して作製された豚丹毒菌弱毒株Koganei株から製造された凍結乾燥生ワクチンがひろく豚丹毒菌感染の防御のために使用されてきたが、問題点として、マウスに関節炎発症の病原性をもつこと、抗体の低い豚やSPF豚において重篤な副作用を示すこと、また慢性豚丹毒症例豚の病変からワクチン株が分離されることが指摘されている。

【0004】一方、不活化ワクチンとしては、豚丹毒菌強毒株の培養菌液をホルマリンで殺菌処理し、その全菌体及び菌体外生産物を水酸化アミニウムゲルに吸着させて製造したバクテリンワクチン及び全菌体からアルカリ水溶液で抽出した菌体表層非精製蛋白質画分から成る成分ワクチンが豚丹毒の予防用ワクチンとして用いられている。アルカリ抽出蛋白質画分中の有効成分としては、64~66kDaの蛋白質抗原がマウスで感染防御活性を示すとされる(Epidemiol. Infect., 107: 637-649, 1991)。

【0005】他方、本菌の防御抗原の遺伝子組換え体としては、GalanとTimonyが豚丹毒菌の5.4kbの遺伝子断片で組換えたファージを感染させた宿主大腸菌の溶解物上清で免疫したマウス群では14~17%が感染死に対する防御活性を示すこと、また、同溶解物上清に対する免疫血清は66、54、43kDaの蛋白質と反応することを示した(Infect. Immun., 58: 3116-3121, 1990)。

【0006】最近、豚丹毒菌に対して感染防御活性を有するモノクローナル抗体が、血清型2型豚丹毒菌Tama96

50

3

株の64 kDaの表面蛋白質を認識すること、またその表面蛋白質の遺伝子がクローニングされ、塩基配列と606アミノ酸の配列が決定され、C末に8個の相似な繰り返し配列（19個のアミノ酸からなる8番目の配列以外は20個のアミノ酸からなる。）をもつことが報告された（*Microbial Pathogenesis*, 25: 101-109, 1998）。この64 kDa蛋白質はSPAと命名されている。

【0007】SPAをコードする遺伝子で組換えた大腸菌の生菌を接種したマウスは、豚丹毒菌の攻撃に対し防御が成立する。またSPAのうち、菌細胞膜に固定する側のC末繰り返し配列部分が防御活性に必須であることが報告された（*Microbial Pathogenesis*, 25: 101-109, 1998）。

【0008】さらに、血清型1型のFujisawa株の感染防御抗原の遺伝子も同様の配列をとるが、C末の繰り返し配列が1個多く、626個のアミノ酸からなり、C末には9個の相似な繰り返し配列（19個のアミノ酸からなる9番目の配列以外は20個のアミノ酸からなる。）をもつこと、その遺伝子がコードする蛋白質は69 kDaの蛋白質であることが示された（今田由美子、*Proc Jpn*

Pig Vet Soc No.34, pp.12-15, 1999）。ここで得られた遺伝子全長または遺伝子全長からC末の繰り返し塩基配列を除いた遺伝子または全長のN末側の一部とC末の繰り返し塩基配列を除いた1029 bpの塩基配列で組換えた大腸菌からヒスチジンヘキサマー融合蛋白質として得られた組換え蛋白質は、フロイントコンプリートアジュvant（実用ワクチン用には使用不可）の存在下で感染防御効果を示したと報告されている（今田、上記）。

【0009】しかし、今まで報告された豚丹毒菌の感染防御抗原の組換え体は、ヒスチジンヘキサマーなどとの融合ポリペプチドとして、しかも大腸菌体内に生産させたものであり、プラスミド宿主菌体外の外分泌系として生産する方法はこれまで知られていない。また豚丹毒菌の感染防御抗原の組換え体を、防御免疫誘導のための実用ワクチンとして利用する免疫方法もない。さらに、粘膜経路（経鼻、経口、経直腸）でのワクチン投与法の開発が、動物へのストレス軽減、省力化、粘膜局所での免疫誘導を目的として要望されているが、豚用の組換え抗原に対する絆粘膜免疫方法による防御免疫付与方法は知られていない。さらにまた、マウスでは大腸菌変異易熱性腸管毒素（mLT）が粘膜アジュvantとして、粘膜投与蛋白質抗原の免疫原性を増強するが（*Immunology*, 90: 176-182, 1997）、豚などの家畜ではmLTの粘膜アジュvant活性は知られていない。

【0010】

【発明が解決しようとする課題】本発明の目的は、安全性と有効性に優れた高純度の豚丹毒菌の防御抗原活性のあるポリペプチド、ならびにその製造方法を提供することである。本発明の別の目的は、上記ポリペプチドを組

10

換えサブユニットワクチンとして使用すること、ならびに動物に対しこのワクチンを投与して豚丹毒菌感染を治療または予防するための方法を提供することである。

【0011】このために、本発明者らは、(a)防御抗原遺伝子の一部ポリヌクレオチドを非融合状態で効率よく外分泌発現させるためのベクター・宿主系を確立すること、(b)その培養液から防御活性の高い組換えポリペプチド抗原を単純工程で精製する実用技術を確立すること、(c)最も発現量が高く収量の優れるポリヌクレオチド断片を特定すること、(d)動物に感染・発病防御免疫を誘導する組換えポリペプチド抗原を選択すること、ならびに、(d)得られた抗原を筋肉、皮下、皮内注射または絆粘膜投与により動物に強力な感染・発病防御免疫を誘導するための技術を確立することを目的として鋭意研究を行ってきた。

20

【0012】

20

【課題を解決するための手段】その結果、本発明者らは、豚丹毒菌（後述の実施例ではIa型菌Fujisawa株を使用した。）の感染防御抗原遺伝子のうち、従来必要とされていたC末の繰り返し配列からなる断片をコードするDNA配列とN末の分泌シグナルをコードするDNA配列を削除したポリヌクレオチドで組換えたバチルス・ブレビスの大量培養液の除菌液から夾雑物を効率的に除去し、防御免疫誘導活性をもつ高純度の46.5kDaのrPPA（46.5kPPAと略す）を製造できる方法を今回見出した。すなわち、46.5kPPAの効率的な分泌生産系を設計し、宿主細菌の培養上清から容易に目的組換えポリペプチドを精製する技術を確立した。また、46.5kPPAを家畜用アジュvantの併用をもって注射することにより、あるいはマウスで粘膜アジュvant活性が知られる大腸菌の変異無毒組換え易熱性腸管毒素（mLT）とともに絆粘膜免疫することにより、豚丹毒菌に対する感染・発病防御免疫能を誘導する技術を確立した。以上の知見から、46.5kPPAは動物の豚丹毒菌感染予防用のサブユニットワクチンとしての利用価値を有することが判明した。また、バチルス・ブレビスで発現して得られた46.5kPPAは豚丹毒菌の副作用に関係する菌体成分を全く含まないため、ワクチンの安全性の改善に貢献する。このような優れた性能をもつ新しいワクチンは動物のみならず人にも応用可能であると考えられる。

30

30

30

30

30

30

30

30

30

30

30

30

30

30

30

30

30

30

30

30

30

30

30

30

30

30

30

30

30

30

30

30

30

30

30

30

30

30

30

30

30

30

30

30

30

30

30

30

30

30

30

30

30

30

30

30

30

30

30

30

30

30

30

30

30

30

30

30

30

30

30

30

30

30

30

30

30

30

30

30

30

30

30

30

30

30

30

30

30

30

30

30

30

30

30

30

30

30

30

30

30

30

30

30

30

30

30

30

30

30

30

30

30

30

30

30

30

30

30

30

30

30

30

30

30

30

30

30

30

30

30

30

30

30

30

30

30

30

30

30

30

30

30

30

30

30

30

30

30

30

30

30

30

30

30

30

30

30

30

30

30

30

30

30

30

30

30

30

30

30

30

30

30

30

30

30

30

30

30

30

30

30

30

30

30

30

30

30

30

30

30

30

30

30

30

30

30

30

30

30

30

30

30

30

30

30

30

30

30

30

30

30

30

30

30

30

30

30

30

30

30

30

30

30

30

30

30

30

30

30

30

30

30

30

30

30

30

30

30

30

30

30

30

30

30

30

30

30

30

30

30

30

30

30

30

30

30

30

30

30

30

30

30

30

30

30

30

30

30

30

30

30

30

30

30

30

30

30

N.A.

(3) 配列表の配列番号2に示すヌクレオチド配列を有する、上記(2)に記載のDNA。

【0014】(4) 上記(1)に記載のポリペプチドの製造方法であって、上記(2)または(3)に記載のDNAを含む発現ベクターを作製し、該ベクターで宿主細胞を形質転換し、該形質転換された宿主細胞を培地に培養し、生成した該ポリペプチドを回収することを含む方法。

(5) 前記宿主細胞がバチルス・ブレビスである、上記(4)に記載の方法。

(6) 前記DNAがその5'末端にバチルス・ブレビス由来のシグナルペプチドをコードするDNA配列を含み、バチルス・ブレビス由来のプロモーターに作動可能に結合されている、上記(5)に記載の方法。

【0015】(7) 上記(4)から(6)のいずれかに記載の方法によって製造されたポリペプチド。

(8) 上記(1)または(7)に記載のポリペプチドを含む豚丹毒菌感染の治療または予防用のワクチン。

(9) アジュvantを含む、上記(8)に記載のワクチン。

(10) 前記アジュvantが大腸菌の変異無毒組換え易熱性腸管毒素(rmLT)である、上記(9)に記載のワクチン。

(11) 上記(1)または(7)に記載のポリペプチドに対する抗体。

【0016】(12) ポリクローナルまたはモノクローナル抗体である、上記(11)に記載の抗体。

(13) 豚丹毒菌に感染したかまたは感染する可能性のある動物(ヒトを除く)に上記(8)～(10)のいずれかに記載のワクチンまたは上記(11)もしくは

(12)に記載の抗体を投与することを含む、豚丹毒菌感染を治療または予防する方法。

(14) 前記投与が鼻腔内投与等の経粘膜投与によって行われる、上記(13)に記載の方法。

【0017】(15) 豚丹毒菌に感染したかまたは感染する可能性のある動物(ヒトを除く)に、上記(1)または(7)に記載のポリペプチドとrmLTアジュvantとの混合物を、場合によりさらに担体を加えて、鼻腔内投与等の経粘膜投与することを含む、豚丹毒菌攻撃に対する感染、発病防御免疫誘導する方法。

(16) 上記(1)もしくは(7)に記載のポリペプチドまたは上記(11)もしくは(12)に記載の抗体の、ワクチン接種動物または移行抗体を保有する幼若動物の豚丹毒菌感染防御免疫レベルの評価、あるいは動物の豚丹毒菌感染の検出への使用。

【0018】本明細書中で使用する「感染、発病防御免疫誘導」、「感染、発病防御免疫誘導活性」、「感染、発病防御免疫誘導能」とは、豚丹毒菌による感染または発病から動物を免疫学的に防御するための抗体産生を生

体内で誘導すること、あるいはそのような誘導活性または誘導能力を意味する。また、本明細書中で使用する「作動可能に」とは、DNAのmRNAへの転写が可能であることを意味する。

【0019】

【発明の実施の形態】本発明は、第1の態様において、豚丹毒菌に対する感染、発病防御免疫誘導活性を有する上記(a)または(b)に規定する配列番号1に示されるアミノ酸配列を有するポリペプチド、およびその変異体を提供する。配列番号1に示すアミノ酸配列を有するポリペプチドは、豚丹毒菌の代表的強毒株であるFujisawa株の感染防御抗原遺伝子クローニング、オープンリーディングフレームの解読、防御抗原遺伝子の特定の塩基配列断片のサブクローニング、発現プラスミドの構築、形質転換宿主細胞での分泌生産、豚丹毒菌に対する防御免疫誘導能の確認によって得ることができる。

【0020】本発明のポリペプチドは、感染防御抗原として必須の領域の探索に基づいて見出されたが、これは今田(上記)によって報告された6.9kDa感染防御抗原

(597アミノ酸)のうち30番目～431番目からなる402アミノ酸(46.5kDaという；図4)で構成されている。従って、本発明のポリペプチドは、6.9kDa抗原のうちN末の29アミノ酸からなる分泌シグナル配列、C末のグリシン、トリプトファンではじまる各20アミノ酸からなる配列の8回の繰り返し配列とその前後の35アミノ酸が取り除かれた配列を有している。C末の繰り返し配列は、該病原菌の膜に固定するためのアンカーの役割を果たしていると推定され、感染防御免疫誘導能をもたないこと、および感染防御抗原を細菌発現させようとするときに、おそらくそのアンカー機能のために、抗原の回収率を著しく悪くさせる原因となることが判明した。さらに、配列番号1に示されるアミノ酸配列のうちN末の60アミノ酸を欠損させた342アミノ酸からなる40kDaポリペプチド抗原を作製し、それのマウスにおける感染致死防御免疫誘導能を測定した結果、同一用量での比較において本発明の46.5kDaポリペプチド抗原より防御免疫誘導能が著しく劣ることが判明した(表2参照)。この結果は、該60アミノ酸が感染防御に極めて重要であることを示唆している。40kDaポリペプチドはまた、組換えDNA技術を用いたバチルス・ブレビスによる発現の際に本発明の46.5kDaポリペプチドの約250分の1の分泌生産量であり(実施例3参照)、該60アミノ酸がポリペプチド抗原の発現分泌にとって必須の領域であることが示唆される。

【0021】このように、本発明のポリペプチドは、免疫学的防御能においても、また発現分泌生産にとっても、豚丹毒菌感染の治療および予防において高い実用性を有している。本発明にはまた、配列番号1に示すアミノ酸配列において1個または数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列を有し、かつ豚丹毒

7

菌に対する感染、発病防御免疫誘導活性を有するポリペプチドも含まれる。

【0022】このような変異の仕方には制限はないが、例えば配列番号1に示すポリペプチドをコードするDNA配列を基にオリゴヌクレオチド部位特異的突然変異法やカセット変異法などの部位特異的突然変異技術（例えば*Short Protocols In Molecular Biology, Third Edition, A Compendium of Methods from Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, Inc.*参照）、PCR（ポリメラーゼ連鎖反応）などの技術を用いて変異DNAを得て、これを適当な宿主細胞で発現させて製造することができる。アミノ酸間の置換では、酸性アミノ酸同士、塩基性アミノ酸同士、疎水性アミノ酸同士で構造的に類似するアミノ酸間の置換があり、このような置換は天然において認められる。例えばバリンとイソロイシン、グルタミン酸とアスパラギン酸、アルギニンとリシンが置換例としてあげられる。欠失については、配列番号1に示すアミノ酸配列のN末の60アミノ酸以外の（単数または複数の）アミノ酸の部分的欠失を考えられるが、あくまでも豚丹毒菌に対する感染、発病防御免疫誘導活性を損なわない範囲で欠失を行う必要がある。付加の場合にも防御免疫誘導活性を損なわない範囲の変異でなければならないが、例えばN末またはC末への（単数または複数の）アミノ酸の付加ができる。この場合、豚丹毒菌6.9kDa感染防御抗原（今田、上記）に認められるN末の29アミノ酸からなる分泌シグナル配列と、C末の繰り返し配列を含む179アミノ酸からなる配列は含むべきではない。配列番号1に示すアミノ酸配列との相同性で言えば、上記変異体は70%以上、好ましくは80%以上、より好ましくは90%以上、特に95%以上の相同性を有しているべきである。この点では、豚丹毒菌のFujisawa株、その変異体だけでなく、その他の株（例えば豚丹毒菌1b型、2a型、2b型など）およびその変異体に由来する同様の抗原断片のすべてが本発明の範囲内である。

【0023】本発明は、第2の態様において、上記(a)、(b)に規定したポリペプチドをコードするDNAを提供する。好適実施態様により、該DNAは配列番号2に示すヌクレオチド配列を有するDNAである。本発明のDNAは、豚丹毒菌の染色体DNAまたはRNAからゲノムクローニングまたはcDNAクローニング法（J. Sambrook et al., *Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Second Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989*）をもちいて得ることができる。例えば、該細菌の染色体DNAまたはRNAからゲノムライブラリーまたはcDNAライブラリーを作製し、適当なプローブを用いて目的のDNAを含むクローンをコロニーハイブリダイゼーションまたはブラークハイブリダイゼーションを利用してスクリーニングするか、あるいは、適当なプライマーを用いてPCR増幅することによって目的

のDNAを得ることができる。必要に応じて、種々の制限酵素によりDNAの制限酵素地図を作成し、これに基づき目的DNAを切り出すことができる。また、得られたDNAをジデオキシン法等の慣用の塩基配列決定法により配列決定し、目的のDNAであることを確認することができる。このようにして配列が判明した場合には、DNA合成機にて目的のDNAを化学的に合成することも可能である。

【0024】上記で使用されるプローブまたはプライマーは、配列番号1に示されるアミノ酸配列または配列番号2に示されるヌクレオチド配列、その相補的配列に基づいて作製することができ、5塩基以上、通常5～60塩基、好ましくは15～30塩基である。それらは特に株間で比較的保存された領域から選択されるのがよい。ハイブリダイゼーション条件は、融解温度（Tm）、イオン強度などを適宜考慮して決定でき、ストリンジェントな条件でのハイブリダイゼーションとその後のストリンジェントな条件での洗浄が望ましい。PCR条件としては、二本鎖DNAを変性させる変性段階（例えば94°C、15～30秒）、一本鎖錆型DNAとプライマーをアニーリングさせるアニーリング段階（例えば54°C、30秒から1分）、DNAポリメラーゼと4種類の基質（dNTP）の共存下でのプライマーの伸長段階（例えば70°C、30秒～1分）を1サイクルとして20サイクル以上操作を繰り返すことができる。但しPCR条件は錆型DNAの濃度、增幅断片のサイズ等に応じて変更され得る。PCR法については例えば、蛋白質核酸酵素41巻5号「PCR法最前線」（1996年4月号増刊）を参照することができる。

【0025】本発明は、第3の態様において、上記に規定したDNAを含む発現ベクターを作製し、該ベクターで宿主細胞を形質転換し、該形質転換された宿主細胞を培地に培養し、生成した該ポリペプチドを回収することを含む、上記に規定したポリペプチドの製造方法を提供する。本発明のポリペプチドは、分泌形態または非分泌形態のいずれで生産されてもよいが、分離精製の容易さから分泌形態が好ましい。分泌形態の場合、該ポリペプチドをコードするDNAの上流に任意のシグナルペプチドをコードするDNA配列を連結させる。

【0026】発現ベクターとしては、原核または真核生物宿主細胞において自律複製可能または染色体中への組込み可能であって、目的DNAの転写が可能な位置にプロモーターを含有しているものを選択できる。ベクターはプラスミド、ファージを含むウイルス、コスミドなどである。ベクターにはさらに、選択マーカー、リボソーム結合部位、複製開始点、ターミネーター、エンハンサー、ポリリンカーなどを適宜含むことができる。細菌等の原核生物用や、菌類、酵母類、昆虫細胞、植物細胞、動物細胞等の真核生物用の種々の発現ベクターが市販されているし、また文献に記載されているか、または寄託

されているものについては分譲入手可能なものもあり、それらから必要なものを入手できる。例えば、原核生物用ベクターとしてpQEシリーズ(プロメガ)、pBluescript IIシリーズ(ストラタジーン)、pETシリーズ(ノバジエン)、pUB110、pNU200(鶴高重三、日本農芸化学会誌、61:669、1987)など、酵母用ベクターとしてpHSシリーズ、pXT1、pSG5(ストラタジーン)、pSVK3、pBPV(ファルマシア)など、動物細胞用としてpcDM8(フナコシ)、pcDNA1/Amp、pREP4(インビトローゲン)など、昆虫細胞用としてpVLシリーズ、pBlueBacIII(インビトローゲン)など、植物細胞用として、Tiプラスミド、タバコモザイクウイルスベクターなどを例示することができるが、これに限定されない。勿論、必要に応じて、市販のまたは文献記載のベクターを改変することも可能であろう。ベクターの構築については、J. Sambrookら(上記)に具体的に記載されており、その内容を参照可能である。

【0027】プロモーターについても、種々のものが文献等で知られており、また市販の発現ベクターに予め組込まれているものもあり、これらを適宜選択し利用できる。例えば、原核生物用としてtrpプロモーター、 lacプロモーター、P_cプロモーター、P_rプロモーターなど、酵母用としてGAPプロモーター、ADHプロモーター、GPDプロモーターなど、動物細胞用としてSV40初期プロモーター、レトロウイルスプロモーター、乳腺細胞特異的プロモーターなど、植物細胞用としてカリフラワーモザイクウイルスの35Sプロモーターなどを例示できるが、これに限定されない。

【0028】宿主細胞として、例えば原核生物としてエシェリシア属、セラチア属、パチルス属、シュウドモナス属などに属する微生物、真核生物としてサッカロマイセス属、シゾサッカロマイセス属、ビチア属などの酵母類、ヒト胎児腎細胞、チャイニーズハムスター卵巣(CHO)細胞などの哺乳動物細胞、スポットテラフルジベルダ卵巣細胞などの昆虫細胞、双子葉および単子葉植物などを例示できるが、これに限定されない。好ましい宿主細胞は、パチルス属、特にパチルス・ブレビス(*Bacillus brevis*)である。形質転換法として、以下のものに限定されないが、塩化カルシウム法、磷酸カルシウム法、酢酸リチウム法、エレクトロポレーション法、プロトプラスト法、スフェロプラスト法、リポフェクション法、アグロバクテリウム法などを用いることができる。

【0029】形質転換された宿主細胞を培地中に培養し、発現ベクターに組込まれた目的DNAを発現させ、蛋白質精製に関する公知の方法を利用して豚丹毒菌の感染防御ポリペプチド抗原を分離精製することができる。ポリペプチド抗原が分泌形態で産生されたときには培地から直接精製できるが、一方、非分泌形態で産生されたときには細胞を分離し、超音波処理、ホモゲナイジング等の処理により細胞を破壊して抽出液を得、この抽出液

からポリペプチド抗原を精製することができる。精製は、溶媒抽出、塩析、脱塩、有機溶媒沈殿、限外濾過、イオン交換、疎水性相互作用、HPLC、ゲル濾過およびアフィニティクロマトグラフィー、電気泳動、等電点電気泳動などの方法を組合せて行うことができる。以下に本発明の好適実施態様について説明する。

【0030】感染防御抗原遺伝子のクローニング

豚丹毒菌の代表的強毒株である血清型1a型のFujisawa株の染色体DNAから防御抗原遺伝子をクローニングするために、これを切断部位の多い4塩基認識制限酵素Sal Iで不完全に消化することによってアランダムに切断後、断片をクローニングベクタープラスミドに連結する。この組換えプラスミドをEscherichia coli(大腸菌)に形質転換し、大腸菌の菌体内で組換え蛋白質を発現させる。選択培地上に発育した大腸菌のコロニーをニトロセルロースメンプランに転写し、メンプランを豚丹毒菌に対する高度免疫血清で免疫染色する。強く染色されるコロニーをクローニングし、発現蛋白質のウエスタンプロットを免疫染色し陽性クローニングを得る。

【0031】陽性クローニングの大腸菌に組換え蛋白質を発現させ、洗浄菌体の超音波処理上清でマウスを免疫し、Fujisawa株攻撃に対する感染防御試験を行う。感染防御活性を示す大腸菌クローニングからプラスミドを精製し、挿入遺伝子の一方向から100~200bpずつ削り、インサートの長さの異なる変異プラスミドを作製する。これらのプラスミドで形質転換した大腸菌の発現蛋白質のウエスタンプロットを免疫染色し、親株との比較から感染防御に必要な遺伝子を特定する。この遺伝子の前後を含む上述の親プラスミドのインサート遺伝子の塩基配列をApplied Biosystems 373 Auto Sequencerで決定する。ついでコンピューター解析により連続してアミノ酸をコードするオープンリーディングフレーム(ORF)領域を特定する。ORF中のシングナルペプチドを除く部分が感染防御抗原をコードする遺伝子とみなす。

【0032】感染防御抗原遺伝子のバチルス・ブレビスでの発現

バチルス・ブレビス HPD31(この菌株はバチルス・ブレビス H102(FERM BP-1087)と同一菌株である。)はタンパク質を菌体外に分泌生産し、培養液中にタンパク質分解酵素を生産しない菌株であり、遺伝子組換えの宿主菌として知られている(特公平4-74997号公報)。

【0033】本発明者らはこのバチルス・ブレビス HPD31に豚丹毒菌の防御抗原遺伝子の一部を組み込んだ形質転換体を作製し、この形質転換体を培養することによって豚丹毒菌の組換えポリペプチドを大量に生産する方法を今回見出した。すなわち、豚丹毒菌の防御抗原の一部のアミノ酸配列をコードする遺伝子を組み込んだバチルス・ブレビスを培養することにより、豚丹毒菌の抗原ペプチドを培養物中に生成、蓄積せしめ、これを採取する。

11

【0034】本発明においてFujisawa株の69kDaに相当する豚丹毒菌の感染防御抗原をコードする遺伝子として見出されたものは、配列番号1に示すアミノ酸配列(402アミノ酸)をコードするDNA、特に配列番号2に示すヌクレオチド配列を有するDNA(1206bp)である。

【0035】この豚丹毒抗原をコードするDNAを含むベクターは、宿主細胞内で複製可能なプラスミドなら如何なるものも使用できる。例えば、バチルス・ブレビスで複製可能なpUB110、pNU200(鶴高重三、日本農芸化学会誌、61、669(1987))、pHY700(S. Ebisu et al., Bio sci. Biotech. Biochem., 56: 812-813(1992))、pHT1 10(特開平6-133782号公報)、これらの誘導体などのプラスミドを使用できる。これらのプラスミドを構築する方法としては、公知の方法が適宜用いられ、例えばJ. Sambrookら、Molecular Cloning 2nd ed., A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, 1989に記載の方法などが例示される。本発明の豚丹毒抗原をコードするDNAの上流には、バチルス・ブレビス由来のプロモーター配列とシグナルペプチド配列が結合されている。該DNAはプロモーターに作動可能に結合されているべきである。

【0036】本発明方法において宿主細胞として用いられる細菌はバチルス・ブレビスであるが、特にバチルス・ブレビスHPD31やその変異株であるバチルス・ブレビスHPD31S-5などが好適に使用できる。宿主菌であるバチルス・ブレビスを形質転換する方法は公知の方法でよく、例えば、Takahashiらの方法(Takahashi et al., J. Bacteriol., 156: 1130, 1983)またはTakagiらの方法(H. Takagi et al., Agric. Biol. Chem., 53: 3099-3 100, 1989)などが例示される。

【0037】形質転換されたバチルス・ブレビスの培養に用いられる培地は、形質転換体が生育して豚丹毒菌ポリペプチドを生産しうるものであれば如何なるものでもよい。該培地に含有される炭素源としては、例えばグルコース、シュークロース、グリセロール、澱粉、デキストリン、糖蜜、有機酸などが用いられる。また窒素源としては、カゼイン、ペプトン、肉エキス、酵母エキス、カザミノ酸、グリシンなどの有機窒素源、尿素、硫酸アンモニウムなどの無機窒素源などが用いられる。その他、塩化カリウム、リン酸一カリウム、リン酸二カリウム、塩化ナトリウム、硫酸マグネシウムなどの無機塩が必要に応じて培地に加えられる。栄養要求性を示す菌はその生育に必要な栄養物質を培地に添加すればよい。該栄養物質としては、アミノ酸類、ビタミン類、核酸などが挙げられる。また、培養に際して必要があれば、培地に抗生物質例えばペニシリン、エリスロマイシン、クロラムフェニコール、バシトラシン、D-サイクロセリン、アンピシリン、ネオマイシンなどを加える。更に必要により、消泡剤、例えば大豆油、ラードオ油、各種界面活性剤などを加えてよい。培地の初発pHは5.0~

12

9.0、さらに好ましくは6.5~7.5である。培養温度は通常15°C~42°C、好ましくは24°C~37°Cであり、培養時間は通常16~166時間、好ましくは24~96時間である。本発明で、形質転換体を前記の条件で培養することによって、培養物中に豚丹毒菌のペプチドが蓄積される。このようにして得られた豚丹毒菌抗原は公知の方法により、例えばUF膜、MF膜などを用いた膜処理、疏安分画法、クロマトグラフィーなど(蛋白質質・核酸の基礎実験法、南江堂(1985))で精製することができる。

【0038】豚丹毒菌ペプチドの回収、精製は、上記のように既知の方法を適時利用して行うが、例えば次のように実施してもよい。先ず、培養物を遠心分離またはMF膜で処理することによって菌体を除いた後、上澄液またはろ過液に疏安を加え、更にその上澄液をUF膜で濾過することにより組換え防御ポリペプチド抗原(PPA)を回収し、更に精製するために分画分子量の異なるUF膜で分画することにより精製を行うことも出来る。分画画分を更にイオン交換樹脂等により分画精製し、必要があれば凍結乾燥してもよい。このようにして得られたPPAの同定は推定分子量及び豚丹毒菌弱毒株で高度免疫したウサギの血清を用いた免疫学的同定法で決定することができる。

【0039】本発明によって、バチルス・ブレビスを宿主菌として、豚丹毒に対する防御免疫を誘導するポリペプチドを大量に生産することが可能となる。従って、上記方法によって製造される免疫原性ポリペプチドも本発明の1つである。本発明はさらに、第4の態様において、上記に規定する本発明のポリペプチドを含む豚丹毒菌感染の治療または予防用のワクチンを提供する。

【0040】PPA抗原の単回用量は、通常5μg以上、好ましくは10μg以上、より好ましくは100μg以上、特に100μgから1mg以上である。ワクチンには免疫を刺激するためのアジュバントを加えるのが好ましい。アジュバントとして、例えば水酸化アルミゲル、ムラミルペプチド、大腸菌の変異無毒組換え易熱性腸管毒素、ミネラルオイル、植物オイルなどのものを使用でき、免疫刺激可能な用量で配合される。但し経粘膜免疫誘導のため的好ましいアジュバントは大腸菌の変異無毒組換え易熱性腸管毒素(rmLT)である。

【0041】免疫誘導能の評価試験は、マウス、ウサギ等の実験動物及び豚を用いた既知の方法を適用して行うが、例えば次のようにしてもよい。凍結乾燥したPPAをリン酸緩衝液(PBS: pH 7.2)に溶解し、ポアサイズ0.45μmのメンブランで濾過滅菌後、公知の家畜用市販アジュバントと等量混合したものを注射用サブユニットワクチンとして供する。ここで使用するアジュバントは水酸化アルミゲル、カリミョウバン、ミネラルオイル、植物オイルなどでよい。アジュバントと等量混合した抗原を動物の皮下、皮内または筋肉内に2~3週間隔で2回注射し、2回目注射の1週以降に豚丹毒菌

強毒株で皮下または皮内攻撃する。攻撃後2週間にわたり生死を観察するか、1週後に安樂死させて、臓器中の豚丹毒菌の存在（感染の有無）を培養検査で確認する。また免疫動物の血清中の免疫抗原に対する特異抗体価をPPAを抗原としたELISA法により検出する。また免疫動物の血清を腹腔内に注射したマウスに2時間後にFujisawa株またはその他の血清型の豚丹毒菌強毒株を皮下接種攻撃し発病・致死防御能から判定する受け身感染防御試験により、ワクチン免疫動物の血中防御抗体レベルを評価する。

【0042】豚丹毒菌組換え抗原による経粘膜免疫誘導は、マウスにおいて粘膜アジュバント作用が知られている豚由来大腸菌の腸管易熱性腸管毒素（LT）の遺伝子変異組換え体と豚丹毒菌組換え抗原との混合溶液を、経口投与、非経口投与（静脈内投与、動脈内投与、筋肉内投与、経皮投与、直腸投与、鼻腔内投与等の経皮膜投与など）によって行うことができる。特に鼻腔内等の経皮膜に噴霧・注入することで十分な免疫能を得ることができることは注目されるべきである。本発明で用いたLTは、LTの毒性発揮に必要なAユニットのA1フラグメントとA2フラグメントの連結部位のトリプシン作用部位(Arg192-Thr193-Ile194)を欠失させた弱毒化変異体（mLT）の組換えmLT(rmLT)を用いる。rmLTの製法はTsujiiらの方法(Immunology, 90: 176-182, 1997)に従った。すなわちLT-AのXbaI-EcoRIフラグメントをBluescript IIISK*-1ベクターに連結し、PCRの錠型として使用する。変異毒素作製のためにAユニットの3アミノ酸部分の塩基配列を欠失させた2種類のPCRプライマーを用いて、PCR産物を得、これをLT遺伝子を含むプラスミド(EWD299)のXbaI-EcoRIサイトに連結し、pTSU135を得た。このプラスミドを宿主大腸菌MV1184に形質転換させ、その組換え大腸菌をCAYE培地（カザミノ酸、酵母エキス、リンコマイシン添加培地）を37℃、24時間振とう培養し、集菌した菌を超音波処理し、その上清に70%濃度に飽和硫安を加えて沈殿を得る。沈殿に含まれるrmLTの精製はTsujiiの方法(Microbiology, 143, 1797-1804, 1997)に従って行うことができる。すなわち、硫安沈殿物をTEAM緩衝液(Tris-EDTA, Azide, NaCl)に溶解・透析後、D-ガラクトースカラムにアブライし、TEN緩衝液で洗浄後、カラムに結合したrmLTを0.3Mガラクトースで溶出する。mLTは、ADPリボシリトランスクフェラーゼ活性を欠いており、マウスに対する下痢原性を減少している。調製したrmLTは冷暗所に溶液状態で保存すれば、動物に対する粘膜アジュバント活性は1年間以上維持している。

【0043】粘膜経路での免疫方法としては、豚丹毒菌組換え抗原と適量のrmLTとの混合液をマウス、ウサギ、ブタの鼻腔内に一定間隔で2回注入または噴霧し、鼻

汁、唾液、血清中の豚丹毒菌組換え抗原に対する特異的抗体レベルをELISA、ウェスタンブロッティング及びマウス受け身感染防御試験により測定する。さらに、免疫動物に対しFujisawa株または他の血清型の豚丹毒強毒菌株生菌を皮下経路で攻撃接種し、発病・致死に対する防御能から免疫効果を評価する。

【0044】従って、本発明には、上記ワクチンを、豚丹毒菌に感染したかまたは感染する可能性のある動物（ヒトを除く）に投与することを含む、豚丹毒菌感染を治療または予防する方法も包含される。抗原刺激すなわち免疫は、アジュバント含有ワクチンで初回免疫後、通常2週間以上の間隔でアジュバント非含有ワクチンでさらに1回～数回免疫して行うことができる。

【0045】この場合、本発明のポリペプチドに対する抗体（ポリクローナル抗体、モノクローナル抗体）で受動免疫することも可能である。そのための抗体は、免疫しようとする動物と同種または異種の動物にポリペプチド抗原を接種して得られた抗血清、あるいは、その抗血清から抗原吸収等により精製したIgG抗体であってよい。また、周知のモノクローナル抗体作製法に従って調製された該ポリペプチド抗原に対するモノクローナル抗体であってもよいが、好ましくは上記ポリクローナル抗体である。

【0046】本発明はさらに、上記に規定したポリペプチドまたは抗体の、ワクチン接種動物または移行抗体を保有する幼若動物の豚丹毒菌感染防御免疫レベルの評価、あるいは動物の豚丹毒菌感染の検出への使用を提供する。検体の種類は以下のものに限定されないが、血液、尿、唾液、糞便、脳脊髄液、細胞、組織等である。検出は周知の方法で行うことができ、例えば凝集反応を利用する方法、沈降反応を利用する方法、標識抗体を利用する方法（例えば蛍光抗体法、酵素抗体法、ラジオイムノアッセイなど）などによって行うことができる。以下本発明を実施例により更に詳しく説明するが、これは例示的なものであり、本発明はこれに限定されるものではない。

【0047】

【実施例】豚丹毒菌Fujisawa株の防御抗原遺伝子のクローニング、同遺伝子の一部のパチス・プレビス用発現ベクターの構築方法及び培養菌液からの精製方法（実施例1～4）及び動物で免疫評価試験（実施例4～7）に関する実施例をあげて、本発明をより詳細に説明する。

【0048】実施例1

豚丹毒菌の感染防御抗原遺伝子のクローニング

感染防御抗原遺伝子のクローニングには、豚に敗血症を起こし最も強毒である血清型1aのFujisawa株の染色体DNAを使用した。染色体DNAはリゾチームとアセチルムラミダーゼで前処理した菌体を、プロテイナーゼKとSDS処理により溶菌し、フェノール・クロロホルム・

50 イソアミルアルコールで除蛋白質後、エタノール沈殿し

て精製した。染色体DNAは4塩基認識制限酵素 Sau3A Iで不完全に消化し、これを10~40%シュークロース密度勾配遠心にかけ、フラクション分画した。クローニングし易い2~8 Kbの断片を含む分画をプールし、制限酵素BamHIで切断し脱リン酸化したpBluescript IIにライゲーションした。これを大腸菌XL1-Blueのコンビーテントセルに形質転換し、100 μg/mlのアンピシリン添加L-寒天培地に拡げ、37°Cで一夜培養した。このコロニーを、予め10 mM IPTGで浸し乾燥させた寒天培地大のニトロセルロースメンブランに転写し、コロニー面を上にして新しいアンピシリン添加L-寒天培地におき、37°Cで5時間培養して組換え蛋白質を発現させた。このコロニープロットを飽和クロロホルム蒸気で殺菌し、リゾチーム、DNaseバッファーで処理し豚丹毒菌で高度免疫した豚抗血清で免疫染色した。強く染色されたコロニーをマスタープレートからクローニングし、免疫プローティングで発現蛋白質の解析を行った。その結果、4種類の抗原発現型が認められた。また、これら4種類の抗原発現型のクローニングからプラスミドを調製し、インサートのサイズ、制限サイトの解析を行った。その結果、4種類の発現型クローニングはそれぞれの型に特有のインサートを持っていた。そこで、4種類の発現型クローニングの各代表株1株を用いて蛋白質発現を行い、組換え大腸菌を超音波処理して組換え蛋白質を溶出させた。

【0049】この超音波処理上清中の蛋白質500 μgをフロイントの不完全アジュバントと混合し、マウスの感染防御試験を行った。その結果、XL1-Blue(pA)とXL1-Blue(pB)の2クローニングにマウス感染防御活性が認められた。XL1-Blue(pA)群は1/4匹が生残し、3/4匹が1~2日の死亡遅延を示し、XL1-Blue(pB)群は2/4匹が1/4匹が3日の生残し、死亡遅延を示した。pBは3.8 Kbの、pAは1.7 Kbのインサートを持っていた。ザザンハイブリダイゼーションの結果、pAとpBは共通のインサート部分を有していた。組換えプラスミドのインサートを一方の端から段階的に削って短くし、変異株を作製するExo-Mung Del etion法により、感染防御活性の発現に必要な領域を解析した。その結果ある程度以上インサートが短くなると抗原が発現されなくなり、抗原の発現に必要な領域はpAのpBluescriptのマルチクローニングサイト上のNot Iサイト側から1~1.1Kbと考えられた。

【0050】次に、抗原の発現に必要な領域とその前後計2,814 bpの塩基配列を決定した(図1)。その結果、感染防御抗原をコードしている1,881 bpの領域が見つかった(図2)。pBは防御抗原遺伝子の全長を保有し、pAは防御抗原遺伝子の3'側584bpを欠いていた。感染防御活性の発現に必要な1~1.1Kbの領域は、pAインサートの5'寄りにあるKpn Iサイトと3'末側のpBluescriptのマルチクローニングサイト上のKpn Iサイトで切り出せる1,029bpの断片と大体同じと考えられた。なお、感染防御抗原はシグナルペプチドを持っていてことから、この

抗原は前駆体として翻訳され、シグナルペプチダーゼにより切断された後、成熟型蛋白質として細胞膜の外に輸送されることがわかった。成熟型蛋白質の推定分子量は68.9kDaで、豚丹毒菌が産生するインタクトな本抗原の分子量と一致した。この抗原のC末にはStreptococcusやClostridiumなどのグラム陽性菌の菌体表層蛋白質の細胞壁への結合に必要と考えられている、20個のアミノ酸を1配列とした8個の繰り返し配列構造が認められた。感染防御活性の発現に必要と考えられたpAの1,029 bpのKpn I断片は、成熟型蛋白質の61~402番目のアミノ酸計342個をコードし、繰り返し配列構造は全く含んでいなかった。

【0051】pAの1,029 bpのKpn I断片を、組換え蛋白質の発現と精製に適した6xHisベクタープラスミドpQE32のKpn Iサイトにサブクローニングした。pQE32組換えプラスミドはpA1.0とした。pA1.0を持つ組換え大腸菌にヒスチジンヘキサマー(6xHis)と感染防御領域との融合蛋白質を作らせ、6Mグアニジンバッファー(pH 8.0)と8Mウレアバッファー(pH 8.0~4.5)を用いた変性下でヒスチジンヘキサマーとニッケルカラムとの親和性を利用してアフィニティー精製した。融合蛋白質は6xHis1.0とした。精製した6xHis1.0についてマウス感染防御活性をみた。1匹あたり50 μgをフロイントの不完全アジュバントと混合し、マウス各群5匹を1回皮下免疫した。免疫3週後に100LD50のFujisawa株で皮下攻撃し、10日間観察した。3/5匹が生残し、2/5匹が1~3日の死亡遅延を示した。そこで、精製した6xHis1.0をフロイントのコンプリートアジュバントと混合し、豚を用いて感染防御活性を確認した。1回につき100 μgあるいは500 μgの6xHis1.0を4週齢の検定豚各群2頭に3~4週間隔で2回筋肉内注射して免疫した。対照群各群2頭はアジュバントだけで免疫した。Fujisawa株4×10⁷ CFUの皮内攻撃により、対照群2頭は3日および4日後に敗血症死したが、100 μgおよび500 μg免疫群は無症状で耐過し、1週後の各臓器からの菌分離でも豚丹毒菌も分離されず、完全に感染防御された。100 μg免疫群について血清型2bの82-875株8×10⁷ CFUの皮内攻撃に対する交差感染防御も調べたところ、対照群2頭は急性敗血症あるいは全身に菱形疹を示し、1週後の菌分離では臓器や皮膚病変から攻撃菌が分離されたが、免疫群は無症状で耐過し、菌分離も陰性で完全に交差感染防御が成立した。

【0052】実施例2

豚丹毒菌の感染防御抗原蛋白質遺伝子のサブクローニング

(1) 大腸菌へのクローニング

図1に示した2,814 bpを含む約3.8kbのインサートを含むプラスミド(実施例1で作製したpB)をテンプレートにして合成した2種類のプライマーERM1(図3、配列番号3)、ERRV1(図3、配列番号4)を用いて豚丹毒菌の感染防御抗原蛋白質遺伝子(図2)の一部(EN1)遺

伝子(en1:図2の268~1,293番目までのポリヌクレオチド:1,026bp)をPCR法で増幅した。同様に2種類のプライマーERM2(図3、配列番号5)、ERRV1(図3、配列番号4)を用いて、en1遺伝子よりさらに180bp長い豚丹毒菌の感染防御抗原蛋白質質の一部(EN2)遺伝子(en2:図2の88~1,293番目までのポリヌクレオチド:1,206bp)をPCR法で増幅した。en1遺伝子の取得には、プライマーERM1とプライマーERRV1を、en2遺伝子の取得にはプライマーERM2とプライマーERRV1を各々100 pmol、Taqポリメラーゼ2.5単位、dNTP200 μM、pSKV2鑄型DNA1 ng、100 μl Taq緩衝液(10 mMトリス-塩酸(pH 8.5)、2.5 mM Mg²⁺、50 mM 塩化カリウム、100 μg/mlウシ血清アルブミン)を混合し、96°Cで30秒保持した後、DNAの熱変性(94°C、60秒)、プライマーのアニーリング(54°C、60秒)、プライマーの伸長(70°C、60秒)を25サイクルさせることによって増幅させた。遺伝子en1(1026bp)とen2(1206 bp)を、0.8%アガロースゲル電気泳動に供し、断片を回収した。プラスミドpT7 Blue(Nova gen社製)と先に得たen1遺伝子、en2遺伝子断片をT4DNAリガーゼを用いて連結した。連結DNAを大腸菌JM109に形質転換し、アンビシリン50mg/ml含有LB寒天培地(1.0% Tryptone、0.5% Yeast Extract、1.0% NaCl、1.5% 寒天、pH 7.0)に塗布して、アンビシリン耐性を持つ株を選択した。選択株よりプラスミドを抽出してen1遺伝子、en2遺伝子を保持するプラスミドpT7 Blue en1、pT7 Blue en2を得た。また、ここで得た株をE. coli JM109/pT7 Blue en1、E. coli JM109/pT7 Blue en2とした。

【0053】(2) バチルス・プレビスへのクローニング
Bacillus brevis PNH300TP17(FERM BP-5641)をNco IとBam HIで処理した後、0.8%アガロースゲル電気泳動に供して4.0 kbの断片を回収した。さらに、pT7 Blue en1、pT7 Blue en2をNco IとBam HIで処理した後、0.8%アガロースゲル電気泳動に供して1026 bpのen1遺伝子断片と1206 bpのen2遺伝子断片を回収し、それぞれを先に得た4.0 kbの遺伝子断片とT4 DNAリガーゼを用いて連結した。連結DNAを用いてバチルス・プレビスHPD31-S5(FERM BP-6623)をエレクトロボレーション法(Agric. Biol. Chem., 53, 3099-3100 (1989))で形質転換し、ネオマイシン50 mg/ml含有TM寒天培地(1%ペプトン、0.2%酵母エキス、0.5%肉エキス、1%グルコース、0.001%FeSO₄、7H₂O、0.001%MnSO₄、4H₂O、0.0001%ZnSO₄、7H₂O、1.5%寒天、pH 7.0)に塗布をして、ネオマイシン耐性を持つ株を選択した。選択株よりプラスミドを抽出してそれぞれen1遺伝子、en2遺伝子を保持するプラスミドpNH300 en1、pNH300 en2を得た(図5)。また、ここで得た株をバチルス・プレビス HPD31-S5/pNH300 en1、バチルス・

プレビス HPD31-S5/pNH300 en2とした。

【0054】実施例3

形質転換体の培養

バチルス・プレビス HPD31-S5/pNH300 en1、バチルス・プレビス HPD31-S5/pNH300 en2を中試験管を用いてネオマイシン50 μg/ml含有TM液体培地3 mlで30°Cで2日間振とう培養を行い、その培養上清をSDS-PAGEにより解析を行った。EN1(HPD31-S5/pNH300 en1培養から得られたPPA)及びEN2(HPD31-S5/pNH300 en2培養から得られたPPA)の推定分子量は、それぞれ40050Da、465564Daであり、それぞれが相当の分子量の位置に染色バンドを示した。以後、EN1は40kPPA、EN2は46.5kPPAと呼ぶ。バンドの濃さより40kPPA分泌生産量は約2 mg/l、46.5kPPAの分泌生産量は約500 mg/lと定量した。すなわち46.5 kPPAは、40kPPAに比べて約250倍の生産量を示した。図6は40kPPA及び46.5kPPAの精製工程とPAGE及びウエスタンプロット像である。

【0055】実施例4

形質転換体の大量培養及び精製

(1) バチルス・プレビス HPD31/pNH300 en2の大量培養及び46.5kPPAの精製

バチルス・プレビス HPD31/pNH300 en2を30リットル(L)のジャーファメンターを用いてネオマイシン50 μg/ml含有TM液体培地にて30°Cで3日間振とう培養を行い、その培養上清をSDS-PAGEおよびマウス豚丹毒菌モノクローナル抗体を用いたウエスタンプロット法により解析を行った。解析の結果、46.5 kDaの大きさのEN2蛋白質質が400 mg/L培地中に生産されている事が確認された。バチルス・プレビス HPD31/pNH300 en2の培養液18をポアサイズ0.45 μmのペリコンカセット膜(ミリポア社)を用いて除菌し、約20Lの培養上清液を得た。次に培養上清液のpHを4.75にし、ポアサイズ0.45 μmのペリコンカセット膜(ミリポア社)を用いて濃縮を行った。pH 4.75の20 mM酢酸バッファーを5 L加水し、濃縮液を回収した。この溶液をpH 8.0に調製し、DEAEトヨバル650M(東ソー株)500mlを充填したカラムに通し、0 M NaCl 20 mM Tris-HCl(pH 8.0)から0.5 M NaCl 20 mM Tris-HCl(pH 8.0)のリニアグラジェントカラムクロマトグラフィーを行い、46.5kPPAを100 mM NaCl画分に溶出した。溶出した200 mlの精製EN液を分画分子量10,000のミニタンカセット膜(ミリポア社)を用いて濃縮し、超純水を加水することにより脱塩を行った。濃縮液の46.5kPPAを回収し、凍結乾燥を行い精製粉末3.6 gを得た。46.5kPPAの純度は80%で、培養液からの回収率は45%であった(表1)。

【0056】

【表1】

豚丹毒菌 46.5kPPA の精製段階における濃度と回収率

精製段階	容積(L)	濃度(mg/L)	46.5kPPA 量(g)	回収率(%)
培養上清	20	400	8.0	100
pH沈殿	5	1000	5.0	63
DEAEカラムクロマト	0.2	20000	4.0	50
凍結乾燥	-	-	3.6	45

【0057】(2) バチルス・ブレビスHPD31/pNH300 e n1の大量培養及び精製

同様の方法で、40kPPAも大量培養、精製を行ったが、生産性が低く、回収率は極めて悪かった。

【0058】実施例5

精製40kPPA及び46.5kPPAによるマウス及びウサギを用いての感染防御免疫能評価

供試したマウスは6～7週齢の雌のd d Yマウス、またウサギは3ヵ月齢の日本白色種であった。先ず、精製PPAはマウスを用いて強毒菌に対する防御免疫能を評価した。凍結乾燥した40kPPA及び46.5kPPAをPBSに溶解し、等量の公知の豚ワクチン用O/Wアジュバント(流動パラフィン0.45ml、乾燥水酸化アルミゲル3.00mg、マンナイドモノオレート0.05ml、ポリソルベート80 0.018ml、塩化ナトリウム2.975mg、りん酸水素二ナトリウム15.15mg、リン酸水素ナトリウム・二水2.83mg、エチルメチルクリチオサルチル酸ナトリウム0.15mg、蒸留水で2mlとする)と等量混合し、タッヂミキサーで1分間攪拌した。これをマウスに2週間間隔で2回0.1mlつつ皮下注射し、その1週後に100LD₅₀のFujisawa株で皮下攻撃し、2週間にわたり生死を観察した。

*30 【表2】

豚丹毒菌 46.5kPPA のマウスにおける感染致死防御免疫誘導能

*【0059】46.5kPPAは1μgで50%以上の防御率を示したが、40kPPAは100μg以上で50%以上の防御率を示し、46.5kPPAは、生産量とともに防御免疫誘導能も40kPPAに比べて優れることが判明した(表2)。そこで以降のウサギ及びブタでの免疫評価試験には46.5kPPAのみを用いた。ウサギに対し、46.5kPPAを1～100μg量をマウスの免疫方法に準じて調製したアジュバント添加ワクチンを筋肉内注射し、2回目注射2週後の血清について、受け身感染防御活性をみた。受け身感染防御試験は、免疫血清をマウスの腹腔内に注射し、その3時間後に100LD₅₀のFujisawa株で攻撃し、2週間生死を観察した。46.5kPPAで免疫したウサギ血清を0.5ml投与したマウスは50%以上の防御率を示した(表3)。以上の成績から、46.5kPPAが防御免疫に関する抗体を誘導する能力が優れていることが判明した。また、Makinらが防御に必要としているC末の繰り返し配列は防御免疫誘導能には必須でないことが明らかとなった。オイルアジュバントと混合した46.5kPPAは、冷暗所に保存すれば、1ヶ月以上は調製直後の免疫力値を維持している。

【0060】

攻撃株	免疫抗原		
	46.5kPPA	40kPPA	
	免疫量(μg)	生残数/攻撃数	生残数/攻撃数
Fujisawa (1型)	100	10/10	7/10
	10	10/10	3/10
	1	9/10	0/10
	0.1	0/10	0/10
SE9 (2型)	100	10/10	5/10
	10	10/10	2/10
	1	8/10	0/10
	0.1	0/10	0/10

【表3】

21

豚丹毒菌 46.5kPPA ($10\mu\text{g}$)で免疫したウサギの血清によるマウス受け身感染防御能

22

攻撃菌株	投与血清量 (m l)	筋肉注射免疫ウサギ血清		経鼻免疫ウサギ血清	
		生残数/攻撃数	生残数/攻撃数	生残数/攻撃数	生残数/攻撃数
Fujisawa (1a型)	0.5	8/10		7/10	
	0.1	2/10		6/10	
	0.02	0/10		0/10	
SE9 (2型)	0.5	7/10		9/10	
	0.1	3/10		1/10	
	0.02	0/10		0/10	

【0062】実施例6

豚における46.5kPPAを用いた感染防御能評価

(1) 筋肉内注射免疫による評価

供試した豚は、豚丹毒ワクチン非接種の母豚から生まれた5~6週齢の子豚であった。精製46.5kPPAをPBSに溶解後、実施例5で記した方法に準じて等量のO/Wアジュバントと混合し、4週齢の子豚に2週間間隔で2回筋肉内注射した。これらの免疫豚に追加免疫3週後にFujisawa株の 1×10^8 で皮内攻撃し、2週間にわたり臨床*

豚丹毒菌 46.5kPPA($100\mu\text{g}$)で筋肉注射免疫した豚の感染・発病防御免疫誘導能

* 症状（体温、皮膚の発疹、元気食欲、生死）を観察し、また2週間後の殺時に臓器（心臓、脾臓、肝臓、腎臓、骨髄）からの豚丹毒菌の分離培養を行った。その結果、 $100\mu\text{g}$ 以上の免疫群の100%が発病を防御し、またこれらの免疫豚の臓器からは豚丹毒菌は全く分離されなかつたことから感染防御効果を確認できた（表4）。

【0063】

【表4】

免疫量 (μg)	発病/攻撃頭数	菌分離頭数/攻撃頭数
1000	0/3	0/3
100	0/3	0/3
10	1/3	1/3
0	3/3	3/3

【0064】(2) 経鼻噴霧免疫による評価

46.5kPPA抗原 $2000\mu\text{g}$ をmLTの $80\mu\text{g}$ 、 $400\mu\text{g}$ または $2000\mu\text{g}/\text{ml PBS}$ と等量混合し、豚の鼻腔内に 1ml づつ2週間に2回噴霧注入し、追加免疫3週後にFujisawa株の 1×10^8 で皮内攻撃し、2週間にわたり臨床症状（体温、皮膚の発疹、元気食欲、生死）

を観察し、また2週間後の殺時に臓器からの豚丹毒菌の※
豚丹毒菌 46.5kPPA ($1,000\mu\text{g}$) と mLT との混合物で経鼻免疫した豚の感染発病防御試験

※ 分離培養を行った。46.5kPPAに $400\mu\text{g}/\text{ml}$ 以上30のmLTと混合したものと經鼻投与した豚群は、Fujisawa株の攻撃接種に対し発病防御を示し、また臓器からの菌分離も陰性であり感染防御効果を確認できた（表5）。

【0065】

【表5】

mLT量 (μg)	発病/攻撃頭数	菌分離頭数/攻撃頭数
2000	0/3	0/3
400	0/3	0/3
80	2/3	3/3
0	3/3	3/3

【0066】実施例7

46.5kPPAで免疫した豚の血清のマウスでの受け身感染防御能及びELISA抗体価
免疫豚の血清のマウス受け身感染防御試験ならびに血清および鼻汁中の46.5kPPAに対するELISA抗体価の測定を

行った。免疫豚血清を用いた受け身感染防御試験は実施例5の記載に準じて行った。筋肉内注射免疫豚血清（表4の46.5kPPA $100\mu\text{g}$ 免疫豚群の追加免疫1週後のプール血清）および経鼻噴霧免疫豚血清（表5の46.5kPPA $1000\mu\text{g} + \text{mLT } 400\mu\text{g}$ 免疫豚群の追加免疫1週後のプール血

清)はともに0.5ml以上を投与したマウスにおいて、Fujisawa株攻撃に対し100%の防御率を示した(表6)。また、筋肉内注射免疫豚および経鼻免疫豚の経過血清中の46.5kPPA抗原に対する特異ELISA抗体価(血清はIgG抗体価を、鼻汁はIgA抗体価を示す。)を表7および表8に示す。ELISA抗体価の測定法には、96穴のマイクロプレートの各ウエルに1μgの46.5kPPAを加え、4°Cで一夜静置後、3%ゼラチンでブロッキングした反応用プレートを用いた。反応用プレートに500倍希釈豚血清を加え、25°Cで90分間反応後、0.1%Tween 20添加PBSで洗浄し、これに抗豚IgGペルオキシダーゼ標識抗体を加え、上記同様に反応させ、洗浄した。最後に発色基質液を加え暗所で10分間反応後、3N硫酸液を加え、450nmに*

*における吸光度を測定し、ELISA抗体価とした。なお、鼻汁液のELISA抗体価測定には、綿棒で採取した鼻腔拭い液を1mlのPBSですすぎ、その上清を5倍希釈したもの用い、抗豚IgAペルオキシダーゼ標識抗体を用いた以外は血清と同様の方法で反応を行った。筋肉内注射免疫した豚の血清ELISA抗体価は2回目免疫1週後に急激な上昇を認め5週後までほぼ高いレベルを維持した。経鼻噴霧免疫豚でも、追加免疫1週後に血清抗体価の急上昇と鼻汁中でのIgA抗体価の上昇が認められ、5週後まで高レベルを維持した。

【0067】

【表6】

豚丹毒菌46.5kPPA免疫豚の血清によるマウス受け身感染防御能

攻撃菌株	投与血清量(ml)	筋肉注射免疫豚血清		経鼻免疫豚血清	
		生残数/攻撃数		生残数/攻撃数	
Fujisawa (1a型)	0.5	10/10		10/10	
	0.1	3/10		4/10	
	0.02	0/10		0/10	
SE9 (2型)	0.5	10/10		10/10	
	0.1	4/10		2/10	
	0.02	1/10		0/10	

【0068】

【表7】

豚丹毒菌46.5kPPA筋肉注射免疫豚の血清及び鼻汁中のELISA抗体価

豚番号	免疫量(μg)	免疫後週数					
		0	1	2	3	4	5
41	1,000	0.12	0.23	0.53	1.53	1.74	1.84
42	1,000	0.04	0.34	0.90	1.73	1.50	1.65
43	1,000	0.06	0.16	0.49	1.38	1.23	1.49
44	100	0.05	0.24	1.22	1.45	1.44	1.35
45	100	0.08	0.15	0.83	1.70	1.94	1.68
46	100	0.14	0.17	0.45	1.72	1.65	1.80
47	10	0.05	0.05	0.94	1.72	1.33	1.24
48	10	0.01	0.03	0.63	1.48	1.32	1.33
49	10	0.03	0.04	0.70	1.15	1.27	1.04
50	0	0.04	0.03	0.14	0.12	0.10	0.18
51	0	0.14	0.02	0.13	0.15	0.17	0.15
52	0	0.02	0.12	0.10	0.07	0.11	0.13

豚番号	mLT量(μg)	免疫後週数					
		血清(100倍希釈)			鼻汁(5倍希釈)		
0	2	5	0	2	5		
61	2,000	0.12	0.32	1.28	0.13	0.16	0.38
62	2,000	0.11	0.21	1.48	0.08	0.14	0.83
63	2,000	0.06	0.22	1.95	0.03	0.32	0.46
64	400	0.12	0.24	1.34	0.04	0.26	0.55
65	400	0.14	0.11	1.58	0.07	0.17	0.76
66	400	0.18	0.20	1.64	0.03	0.18	0.55
67	80	0.04	0.11	1.54	0.04	0.09	0.80
68	80	0.03	0.13	1.82	0.07	0.14	0.75
69	80	0.06	0.14	1.69	0.02	0.26	0.33
70	0	0.03	0.12	0.32	0.05	0.14	0.25
71	0	0.13	0.08	0.27	0.11	0.13	0.13
72	0	0.10	0.12	0.21	0.15	0.12	0.19

【0069】

【表8】

【0070】

【発明の効果】豚丹毒菌1型菌強毒株Fujisawa株の69kDa(597アミノ酸から成るポリペプチド)の感染防御抗原について、2型菌Tama96株では防御抗原(64kDa)の防御活性に必須とされているC末の20アミノ

Glu Gly Met Ser Leu Gln Asn Ile His His Met Phe Lys Gln Ser Ile
 85 90 95
 Gln Asn Leu Ala Thr Arg Ile Gly Tyr Arg Ser Phe Met Gln Asp Ala
 100 105 110
 Met Tyr Leu Glu Asn Phe Glu Arg Leu Thr Ile Pro Glu Leu Asp Glu
 115 120 125
 Ala Tyr Val Asp Leu Leu Val Asn Tyr Glu Val Lys His Arg Ile Leu
 130 135 140
 Val Lys Tyr Glu Gly Lys Val Lys Gly Arg Ala Pro Leu Glu Ala Phe
 145 150 155 160
 Ile Val Pro Leu Arg Asp Arg Ser Met Asn Glu Ile Ala Ala
 165 170 175
 Glu Val Asn Tyr Leu Pro Glu Ala His Glu Asp Phe Leu Val Ser Asp
 180 185 190
 Ser Ser Glu Tyr Asn Asp Lys Leu Asn Asn Ile Asn Phe Ala Leu Gly
 195 200 205
 Leu Gly Val Ser Glu Phe Ile Asp Tyr Asn Arg Leu Glu Asn Met Met
 210 215 220
 Glu Lys Glu Leu His Pro Leu Tyr Leu Glu Leu Tyr Ala Met Arg Arg
 225 230 235 240
 Asn Arg Gln Ile Gln Val Val Arg Asp Val Tyr Pro Asn Leu Glu Arg
 245 250 255
 Ala Asn Ala Val Val Glu Ser Leu Lys Thr Ile Lys Asp Ile Lys Gln
 260 265 270
 Arg Gly Lys Leu Gln Glu Leu Leu Glu Ile Tyr Ile Gln Arg Ser
 275 280 285
 Gly Asp Val Arg Lys Pro Asp Val Leu Gln Arg Phe Ile Gly Lys Tyr
 290 295 300
 Gln Ser Val Val Asp Glu Glu Lys Asn Lys Leu Gln Asp Tyr Leu Glu
 305 310 315 320
 Ser Asp Ile Phe Asp Ser Tyr Ser Val Asp Gly Glu Lys Ile Arg Asn
 325 330 335
 Lys Glu Ile Thr Leu Ile Asn Arg Asp Ala Tyr Leu Ser Met Ile Tyr
 340 345 350
 Arg Ala Gln Ser Ile Ser Glu Ile Lys Thr Ile Arg Ala Asp Leu Glu
 355 360 365
 Ser Leu Val Lys Ser Phe Gln Asn Glu Glu Ser Asp Ser Lys Val Glu
 370 375 380
 Pro Glu Ser Pro Val Lys Val Glu Lys Pro Val Asp Glu Glu Lys Pro
 385 390 395 400
 Lys Asp

<210> 2

<211> 1206

<212> DNA

<213> Erysipelothrix rhusiopathiae

<400> 2

gattcgacag atatttctgt gattccacta atcgggtgaac aagtggatt gctcccagg 60

29

30

ttacctggaa caqqqgtaca tgctcaqqaa tacaacaaa	tqactqatqc ttatattqaa	120
aaatttgtat ctctaattaa taaaaagtq aqccgttc ttataaatqa	gccaagggg	180
taccaaagtt tcqaagcagt gaatqaagag attaactcga	ttgtaaqtqa actaaaaat	240
gaaggaaatqa qtcttcaaaa cattcaccat atqtttaaac	aaqcatcca aaacctagca	300
actagaatcq qctacagaag ttttatqcaq gatqctatgt	atcttgaaaaa ttttqaaqa	360
ttaacgattc ctqaacttqa tqaqcatac gttgatttac	tcgtqaatta cgaggtqaaa	420
caccgtattt tagtaaaaata tqaaggtaaa gttaaaggta	gagctccctt agaaggcattt	480
atagttcctc taqagataq aattcgtatq	atqaatqaaa ttgctgcaga agtaaattat	540
ttacctgaaq cqcatgagga tttcttagtt tcaagattca	qcgagtataaa tqacaaacta	600
aataatatca actttgctt qqqtctaggg qtcagcqagt	ttattqacta taaccggctc	660
qaaaatatqa tggaaaaaga acttcatcca ctgtatcttq	aactttatqc tatgcggaga	720
aatcgc当地 ttcaagttgt aqagatqta tatccaaact	tqgaacgtqc gaacgcggtt	780
qttqaatcct taaagacaat taaagatata aaacaaagag	qqaagaaact acaggaactt	840
cttggaaattt atatccaaag aagtggagat qttcqaaaac	caqatqtact ccaacgattt	900
attggaaaat atcaatcq aqttqatqaa gaaaaaaaaa	aacttcaaga ttatttqaa	960
tcagatattt ttgattcata tagtqatqatqaa	qgcqagaaaa taagaaataa agaaattaca	1020
ctcatcaata gagatqcata cttatctatq atttacqag	ctcaatcqat ttcgqaaatt	1080
aagacgattc gtqagatqaa aqaaatcatq tccaaaatqa	agaaaagtqac	1140
tctaaagtag aqccqaaaq tcccgttaaa qtagaaaaac	cagtqatqaa agaaaaacct	1200
aaagat		1206

<210> 3

<211> 36

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Designated is a primer for PCR cloning of 1026 bp polynucleotides encoding 40 kPPA.

<400> 3

ccatqgcttt cqcttaccaa agtttcqaaq cagtqa

36

<210> 4

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Designated is a primer for PCR cloning of 1026 bp polynucleotides encoding 40 kPPA or 1206 bp polynucleotides encoding 46.5 kPPA.

<400> 4

ggatccttaa tcttttaggtt tttcttcatc

30

<210> 5

<211> 34

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

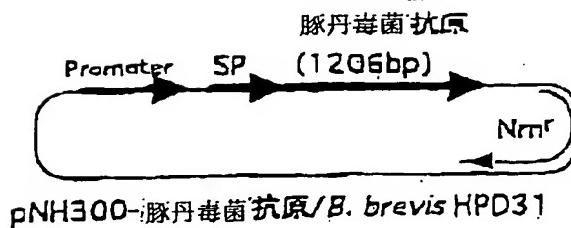
【図1A】

GATCTATTAA TGAATCCAAT CTAGGGAAAT ACCTAGCCTC TTATGTTTA GATAAAGGGG	60
AAGCGTTTGT CGAACGATATT CAGTGGTAC TTAAGACGAT GAATACTGCG GTTTATAAAC	120
GCCTGCAAAT GCCACCCATT GTTATGGTAT CCAATTGCGC ATTTGGTACC GTTTATCGCG	180
AGAGTCAACT GAGATTGCAC CTTACGCAA CTGAGCAAA TTTAATGAAT CAAATTAAAAA	240
ATCTATAACT CTAACACCAT CTTACTAAGG TGTTTTCT TTTAAAAGTA ATGTATACAT	300
TTCTTCTTT ACTACTAAAA AGAGTATATT AAATAAATTG TTTACAATT ATGTCACAT	360
ATATTATTCT TCAAGTGGAA ATCAAGAGGG GGATAAATTG TGAAAAGAA AAAACACCTA	420
TITCCGAAAG TAAGTCTTAT GTCTGCTTA CTTAACAG CAATGCCACT ACAAACAGCT	480
TTTGCTGATT CGACAGATAT TTCTGTGATT CCACAACTCG GTGAACAAGT TGATTGCTC	540
CCAGTTTAC CTGGACAGG GGTACATGCT CAGGAATACA ACAAAATGAC TGATGCTTAT	600
ATTGAAAAT TGGTATCTT AATTAATCAA AAAGTGAAGC CGTTTCTTAT AAATGAGCCA	660
AAGGGTACCA AAGTTTCA AGCAGTGAAT GAAGAGATTA ACTCGATTGT AAGTGAACCT	720
AAAAATGAAG GAATGAGTCT TCAAAACATT CACCATATGT TTAAACAAAG CATCCAAAAC	780
CTAGCAACTA GAATCGGCTA CAGAAGTTT ATGCCAGATG CTATGATCT TGAAAATTTT	840
GAAAGATTAA CGATTCCTGA ACTTGATGAA GCATACGTTG ATTTACTCCT GAATTACGAG	900
GTGAAACACC GTATTTAGT AAAATATGAA GGTAAAGTT AAGGTAGGC TCCCTTAGAA	960
GCATTTATAG TTCTCTAAG AGATAGAATT CGTAGTATGA ATGAAATTGC TGCGAGAGTA	1020
AATTATTAC CTGAAGCGCA TGAGGATTC TTAGTTCTAG ATTCAAGCGA GTATAATGAC	1080
AAACTAAATA ATATCAACTT TGCTTGGGT CTAGGGTCA GCGAGTTAT TGACTATAAC	1140
CGGCTCGAAA ATATGATGGA AAAAGAACTT CATCCACTGT ATCTTGAAC TTATGCTATG	1200
CGGAGAAATC GCCAAATTCA AGTTGTAAGA GATGTATATC CAAACTTGGG ACGTGCGAAC	1260
GCGGTTGTTG AATCCTTAAA GACAATTAAA GATATAAAC AAAGAGGGAA GAAACTACAG	1320
GAACTTCTTG AAATTTATAT CCAAAGAAGT GGAGATGTC CAAACACCAGA TGTACTCCAA	1380
CGATTTATTG GAAAATATCA ATCAGTAGTT GATGAAGAAA AAAATAAACT TCAAGATTAT	1440
TTAGAATCAG ATATTTTGA TTCTATAGT GTGGATGGCG AGAAAATAAG AAATAAAGAA	1500
ATTACACTCA TCAATAGAGA TGCATACTTA TCTATGATT ACAGAGCTCA ATCGATTTCG	1560
GAAATTAAGA CGATTCGTGC AGATTTAGAA TCACTTCTCA AACATTCCA AAATGAAGAA	1620
AGTGAATCTA AAGTAGAGCC TGAAAGTCCC GTTAAACTAG AAAACCAAGT TGATGAAGAA	1680
AAACCTAAAG ATCAAAAGAA GCTAGTTGAT CAATCAAAC CCGAACATCGAA TTCAAAAGAA	1740
GGGTGGATTA AGAAAGATAA TAAAGTGGTTC TATATTGAGA AATCAGGTGG AATGGCAACA	1800
GGTTGGAAGA AGTAGGAGA CAAATGGTAC TACCTCGATA ATACGGGTGC TATAGTTACG	1860
GGTTGGAAGA AGTAGGAGA CAAATGGTAC TATCTGAAA AATCAGGTGC GATGGCAACA	1920
GGATGGAAGA AAGTATCAA CAAGTGGTAC TACCTGAAA ACTCAGGTGC AATGGCAACA	1980
GGATGGAAGA AAGTATCAA CAAGTGGTAC TACCTGAAA ATTCAAGGCGC AATGGCTACA	2040
GGATGGAAGA AGTAGGAGA CAAATGGTAC TACCTGAAA ACTCAGGTGC GATGGCAACA	2100
GGATGGAAGA AAGTATCAA CAAGTGGTAC TACCTGAAA ACTCAGGTGC AATGGCTACA	2160
GGATGGAAGA AGTAGGAGA CAAATGGTAC TACCTGAAA ACTCAGGTGC GATGGCAACA	2220
GGATGGAAGA AAGTATCAA CAAGTGGTAC TACCTGATA AATCAGGAAT GATGGTTACA	2280
GGTTCAAAAT CTATTGATGG TAAAAAGTAT GCATTTAAGA ACGATGCAAG TTTAAAATAG	2340
ACGGGATATC CCGTCTATT TTTATGAATT TATGAAATT TCATTGAT ATATTTTAT	2400
ACATTTTTA AGTAAATGTA TTGCACATTA AAATAAATAG GAATATACTA ATAAATGAAC	2460
GTCTCTCATT ATATGATCAA TGTACAATT TATGTAATAT TTTGAAACA TCTTTAATGC	2520
GAGGGTTAAA AAAATAACC TAAACTTGA TGTGCTAAGA TATGCATAGA TAAGAAAGAG	

[図2]

ATGAAAAAGA AAAAACACCT ATTTCCGAAA GAACTCTTA TGTGTCGCTT ACTTTTAACA	60
GCAATGCCAC TACAAACAGC TTTTGCTGAT TCGACAGATA TTTCTGTGAT TCCACTAATC	120
GGTGAACAAG TTGGATTGCT CCCAGTTTTA CCTGGGACAG GGGTACATGC TCAGGAATAC	180
AACAAAATGA CTGATGCTTA TATTGAAAAA TTGGTATCTC TAATTAATCA AAAAGTGAAG	240
CCGTTCTTA TAAATGAGCC AAAGGGTAC CAAAGTTCG AACCACTGAA TCAAGAGATT	300
AACTCGATTG TAAGTGAAC TAAAAATGAA GGAATGAGTC TTCAAAACAT TCACCATATG	360
TITAAACAAA GCATCCAAAA CCTAGCAACT AGAATCCGCT ACAGAAGTTT TATGCAGGAT	420
GCTATGTATC TTGAAAATTG TGAAAGATTG ACGATTCTG AACTGTGATGAGCATACGTT	480
GATTACTCG TGAATTACGA GGTGAAACAC CGTATTCTAG TAAAATATGA AGGTAAAGTT	540
AAAGGTAGAG CTCCCTTAAAGCATTATA GTTCCCTAAAG GAGATAGAAT TCGTAGTATG	600
AATGAAATTG CTGAGAAGT AAATTATTAA CCTGAAAGGC ATGAGGATTCTTACGTTCA	660
GATTCAAGCG AGTATAATGA CAAACTAAAT AATATCAACT TTGCTTGGG TCTAGGGGTC	720
AGCGAGTTA TTGACTATAA CCGGCTCGAA AATATGATGG AAAAAGAACT TCATCCACTG	780
TATCTGAAC TTATGCTAT GCGGAGAAAT CCCAAATTCAAGTGTAAAG AGATGTATAT	840
CCAAACTTGG AACGTGCGAA CGCGGTTGTT GAATCCTAA AGACAATTAA AGATATAAAA	900
CAAAGAGGGA AGAAACTACA GGAACTCTT GAAATTATAA TCCAAAGAAG TGGAGATGTT	960
CGAAAACAG ATGTAATCCA ACGATTATT GGAAAATATC AATCACTAGT TGATGAAGAA	1020
AAAAATAAAC TTCAAGATTA TTAGAAATCA GATATTTTG ATTCAATATAG TGTGGATGGC	1080
GAGAAAATAA GAAATAAAGA AATTACACTC ATCAATAGAG ATGCATACTT ATCTATGATT	1140
TACAGAGCTC AATCGATTTC GGAAATTAAAG ACGATTCTG CAGATTTAGA ATCACTTGTC	1200
AAATCATTCC AAAATGAAGA AAGTGAECT AAAGTAGAGC CTGAAACTCC CGTTAAACTA	1260
AAAAAACCAG TTGATGAAGA AAAACCTAAAGTCAAAGA AGCTAGTTGA TCAATCAAA	1320
CCCGAATCGA ATTCAAAAGA AGGGTGGATT AAGAAAGATA ATAAGTGGTT CTATATTGAG	1380
AAATCAGGTG GAATGCCAAC AGGTGGAAG AAGTAGGAG ACAAAATGGTA CTACCTCGAT	1440
AATACGGGTG CTATAGTTAC GGGTTGGAAG AAGTAGCAA ACAAAATGGTA CTATCTTGAA	1500
AAATCAGGTG CGATGCCAAC AGGATGGAAG AAGTATCAA ACAAGTGGTA CTACCTTGAA	1560
AACTCAGGTG CAATGCCAAC ACCATGGAAG AAGTATCAA ACAAGTGGTA CTACCTTGAA	1620
AATTCAAGCG CAATGGCTAC AGGATGGAAG AAGTAGCAA ACAAAATGGTA CTACCTTGAA	1680
AACTCAGGTG CGATGCCAAC AGGATGGAAG AAGTATCGA ACAAGTGGTA CTACCTTGAA	1740
AACTCAGGGC CAATGGCTAC AGGATGGAAG AAGTAGCAA ACAAAATGGTA CTACCTTGAT	1800
AAATCAGGAA TGATGGTTAC AGGTTCAAAA TCTATTGATG GTAAAAAGTA TGCATTTAAG	1860
AACGATGGAA GTTTAAAATA A	1881

[図5]



[図4A]

GAT TCG ACA GAT ATT TCT GTG ATT CCA CTA ATC GGT GAA CAA GTT GGA 48
 Asp Ser Thr Asp Ile Ser Val Ile Pro Leu Ile Gly Glu Gln Val Gly
 5 10 15

TTG CTC CCA GTT TTA CCT GGG ACA GGG GTA CAT GCT CAG GAA TAC AAC 96
 Leu Leu Pro Val Leu Pro Gly Thr Gly Val His Ala Gln Glu Tyr Asn
 20 25 30

AAA ATG ACT GAT GCT TAT ATT GAA AAA TTG GTA TCT CTA ATT AAT CAA 144
 Lys Met Thr Asp Ala Tyr Ile Glu Lys Leu Val Ser Leu Ile Asn Gln
 35 40 45

AAA GTG AAG CCG TTT CTT ATA AAT GAG CCA AAG GGG TAC CAA AGT TTC 192
 Lys Val Lys Pro Phe Leu Ile Asn Glu Pro Lys Gly Tyr Gln Ser Phe
 50 55 60

GAA GCA GTG AAT GAA GAG ATT AAC TCG ATT GTA AGT GAA CTT AAA AAT 240
 Glu Ala Val Asn Glu Glu Ile Asn Ser Ile Val Ser Glu Leu Lys Asn
 65 70 80

GAA GGA ATG AGT CTT CAA AAC ATT CAC CAT ATG TTT AAA CAA AGC ATC 288
 Glu Gly Met Ser Leu Gln Asn Ile His His Met Phe Lys Gln Ser Ile
 85 90 95

CAA AAC CTA GCA ACT AGA ATC GGC TAC AGA AGT TTT ATG CAG GAT GCT 336
 Gln Asn Leu Ala Thr Arg Ile Gly Tyr Arg Ser Phe Met Gln Asp Ala
 100 105 110

ATG TAT CTT GAA AAT TTT GAA AGA TTA ACG ATT CCT GAA CTT GAT GAA 384
 Met Tyr Leu Glu Asn Phe Glu Arg Leu Thr Ile Pro Glu Leu Asp Glu
 115 120 125

GCA TAC GTT GAT TTA CTC GTG AAT TAC GAG GTG AAA CAC CGT ATT TTA 432
 Ala Tyr Val Asp Leu Val Asn Tyr Glu Val Lys His Arg Ile Leu
 130 135 140

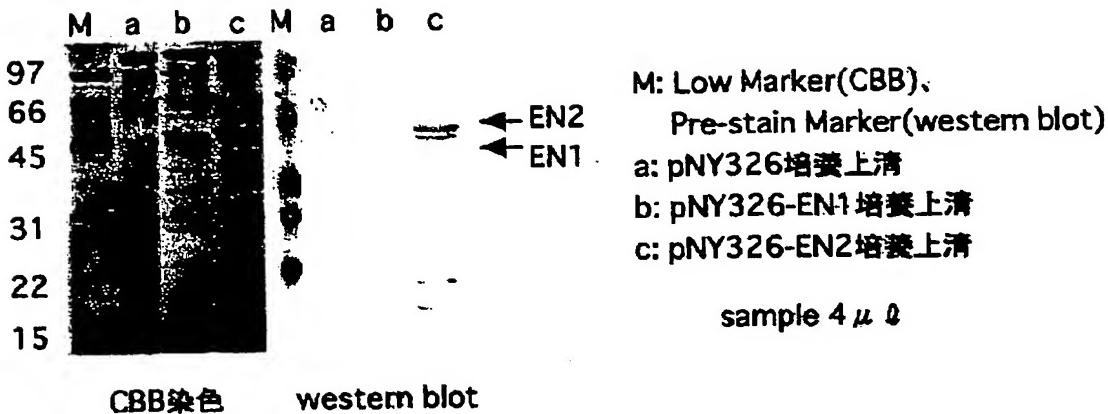
GTA AAA TAT GAA GGT AAA GGT AAA GGT AGA GCT CCC TTA GAA GCA TTT 480
 Val Lys Tyr Glu Gly Lys Val Lys Gly Arg Ala Pro Leu Glu Ala Phe
 145 150 155 160

ATA GTT CCT CTA AGA CAT AGA ATT CGT AGT ATG AAT GAA ATT GCT GCA 528
 Ile Val Pro Leu Arg Asp Arg Ile Arg Ser Met Asn Glu Ile Ala Ala
 165 170 175

【図4B】

GAA GTA AAT TAT TTA CCT GAA CGG CAT GAG GAT TTC TTA GTT TCA GAT 576
 Glu Val Asn Tyr Leu Pro Glu Ala His Glu Asp Phe Leu Val Ser Asp
 180 185 190
 TCA AGC GAG TAT AAT GAC AAA CTA AAT AAT ATC AAC TTT GCT TTG GGT 624
 Ser Ser Glu Tyr Asn Asp Lys Leu Asn Asn Ile Asn Phe Ala Leu Gly
 195 200 205
 CTA CGG GTC AGC GAG TTT ATT GAC TAT AAC CGG CTC GAA AAT ATG ATG 672
 Leu Gly Val Ser Glu Phe Ile Asp Tyr Asn Arg Leu Glu Asn Met Met
 210 215 220
 GAA AAA GAA CTT CAT CCA CTG TAT CTT GAA CTT TAT GCT ATG CGG AGA 720
 Glu Lys Glu Leu His Pro Leu Tyr Leu Glu Leu Tyr Ala Met Arg Arg
 225 230 235 240
 AAT CGC CAA ATT CAA GTT GTA AGA GAT GTA TAT CCA AAC TTG GAA CGT 768
 Asn Arg Gln Ile Gln Val Val Arg Asp Val Tyr Pro Asn Leu Glu Arg
 245 250 255
 GCG AAC GCG GTT GTT GAA TCC TTA AAG ACA ATT AAA GAT ATA AAA CAA 816
 Ala Asn Ala Val Val Glu Ser Leu Lys Thr Ile Lys Asp Ile Lys Gln
 260 265 270
 AGA GGG AAG AAA CTA CAG GAA CTT CTT GAA ATT TAT ATC CAA AGA AGT 864
 Arg Gly Lys Lys Leu Gln Glu Leu Leu Glu Ile Tyr Ile Gln Arg Ser
 275 280 285
 GGA GAT GTT CGA AAA CCA GAT GTA CTC CAA CGA TTT ATT GGA AAA TAT 912
 Gly Asp Val Arg Lys Pro Asp Val Leu Gln Arg Phe Ile Gly Lys Tyr
 290 295 300
 CAA TCA GTA GTT GAT GAA GAA AAA AAT AAA CTT CAA GAT TAT TTA GAA 960
 Gln Ser Val Val Asp Glu Glu Lys Asn Lys Leu Gln Asp Tyr Leu Glu
 305 310 315 320
 TCA GAT ATT TTT GAT TCA TAT AGT GTG GAT GGC GAG AAA ATA AGA AAT 1008
 Ser Asp Ile Phe Asp Ser Tyr Ser Val Asp Gly Glu Lys Ile Arg Asn
 325 330 335
 AAA GAA ATT ACA CTC ATC AAT AGA GAT GCA TAC TTA TCT ATG ATT TAC 1056
 Lys Glu Ile Thr Leu Ile Asn Arg Asp Ala Tyr Leu Ser Met Ile Tyr
 340 345 350

[図6]



【手続補正書】

【提出日】平成12年2月17日(2000.2.17)

【手続補正1】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】請求項16

【補正方法】変更

【補正内容】

【請求項16】 請求項1もしくは7に記載のポリペプチドまたは請求項11もしくは12に記載の抗体の、ワクチン接種動物(ヒトを除く)または移行抗体を保有する幼弱動物(ヒトを除く)の豚丹毒菌感染防御免疫レベルの評価、あるいは動物(ヒトを除く)の豚丹毒菌感染の検出への使用方法。

【手続補正2】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0017

【補正方法】変更

【補正内容】

【0017】(15) 豚丹毒菌に感染したかまたは感染する可能性のある動物(ヒトを除く)に、上記(1)または(7)に記載のポリペプチドとmLTアジュvantとの混合物を、場合によりさらに担体を加えて、鼻腔内投与等の経粘膜投与することを含む、豚丹毒菌攻撃に対する感染、発病防御免疫誘導する方法。

(16) 上記(1)もしくは(7)に記載のポリペプチドまたは上記(11)もしくは(12)に記載の抗体の、ワクチン接種動物(ヒトを除く)または移行抗体を保有する幼弱動物(ヒトを除く)の豚丹毒菌感染防御免疫レベルの評価、あるいは動物(ヒトを除く)の豚丹毒菌感染の検出への使用方法。

【手続補正3】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0022

【補正方法】変更

【補正内容】

【0022】このような変異の仕方には制限はないが、例えば配列番号1に示すポリペプチドをコードするDNA配列を基にオリゴヌクレオチド部位特異的突然変異法やカセット変異法などの部位特異的突然変異技術(例えばShort Protocols In Molecular Biology, Third Edition, A Compendium of Methods from Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, Inc.参照)、PCR(ポリメラーゼ連鎖反応)などの技術を用いて変異DNAを得て、これを適当な宿主細胞で発現させて製造することができる。アミノ酸間の置換では、酸性アミノ酸同士、塩基性アミノ酸同士、疎水性アミノ酸同士で構造的に類似するアミノ酸間の置換があり、このような置換は天然においても認められる。例えばバリンとイソロイシン、グルタミン酸とアスパラギン酸、アルギニンとリシンが置換例としてあげられる。欠失については、配列番号1に示すアミノ酸配列のN末の60アミノ酸以外の(単数または複数の)アミノ酸の部分的欠失を考えられるが、あくまでも豚丹毒菌に対する感染、発病防御免疫誘導活性を損なわない範囲で欠失を行う必要がある。付加の場合にも防御免疫誘導活性を損なわない範囲の変異でなければならないが、例えばN末またはC末への(単数または複数の)アミノ酸の付加が可能であろう。この場合、豚丹毒菌6.9kDa感染防御抗原(今田、上記)に認められるN末の29アミノ酸からなる分泌シグナル配列と、C末の繰り返し配列を含む179アミノ酸からなる配列は含むべきではない。配列番号1に示すアミノ酸配列とのアミノ酸レベルでの相同性(整列比較によ

る配列類似性)で言えば、上記変異体は9.5%を超える
相同性を有しているべきである。この点では、豚丹毒菌
のFujisawa株、その変異体だけでなく、その他の株(例 *

* えば豚丹毒菌1b型、2a型、2b型など)およびその変異体
に由来する同様の抗原断片のすべてが本発明の範囲内
である。

フロントページの続き

(51)Int.C1.⁷ 識別記号

C 0 7 K	16/12
C 1 2 P	21/02
	21/08
G 0 1 N	33/569
	33/577
//(C 1 2 N	15/09
C 1 2 R	1:01)
(C 1 2 P	21/02
C 1 2 R	1:08)

(72)発明者 高木 広明
千葉県銚子市中央区2番地の8 ヒゲタ醤油株式会社研究部内
(72)発明者 恵比寿 省吾
千葉県銚子市中央区2番地の8 ヒゲタ醤油株式会社研究部内
(72)発明者 渡辺 史子
千葉県銚子市中央区2番地の8 ヒゲタ醤油株式会社研究部内
(72)発明者 村橋 保昭
千葉県銚子市中央区2番地の8 ヒゲタ醤油株式会社研究部内
(72)発明者 横溝 祐一
茨城県つくば市並木4丁目11 919-103

F I	マーク(参考)
C 0 7 K 16/12	
C 1 2 P 21/02	C
	21/08
G 0 1 N 33/569	F
	33/577

(72)発明者 今田 由美子
茨城県つくば市吾妻1丁目18-1 405-
404
(72)発明者 辻 孝雄
愛知県豊明市沓掛町田楽ヶ窪1-98 学校
法人 藤田学園内
F ターム(参考) 4B024 AA01 BA31 BA43 CA04 DA07
EA04 GA05 GA11 HA01
4B064 AG27 AG31 CA02 CA10 CA19
CA20 CC24 DA01
4C085 AA03 AA13 AA14 AA38 BA13
CC07 CC23 CC32 DD61 EE01
EE06 FF14 FF19 GG10
4H045 AA10 AA11 AA30 BA10 CA42
DA76 DA86 EA29 FA72 FA74
GA22 GA23